

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2002年8月15日(15.08.02)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 02/62985 A1

(51) 国际分类号⁷: C12N 13/00, 1/16, A61K 35/72, 41/00

(21) 国际申请号: PCT/CN01/00118

(22) 国际申请日: 2001年2月8日(08.02.01)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 六林生物科学研究所有限公司(SIX FOREST BIO-SCIENCE INSTITUTE LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区中环皇后道中99号中环中心45字楼, Hong Kong (CN).

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 黄金富(WONG, Kamfu) [CN/CN]; 中国香港特别行政区沙田径口3号, Hong Kong (CN).

(74) 代理人: 中国专利代理(香港)有限公司(CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.); 中国香港特别行政区湾仔港湾道23号康君中心22字楼, Wanchai, Hong Kong Special Administrative Region (CN).

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

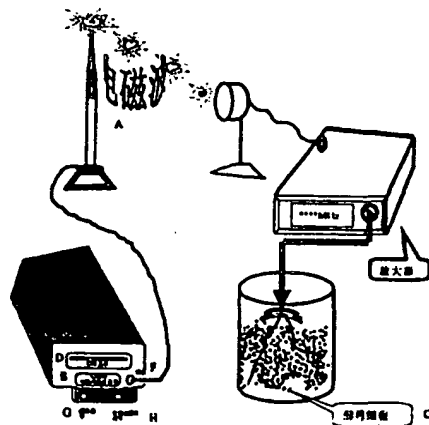
本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A YEAST WITH NK CELL IMMUNOREGULATORY ACTIVITY AS WELL AS THE PREPARING METHOD AND THE USES THEREOF

(54) 发明名称: 具有NK细胞免疫调节活性的酵母及其制法和应用



A—ELECTROMAGNETIC WAVE
B—AMPLIFIER
C—YEAST CELLS
D—FREQUENCY DISPLAY
E—ELECTROMAGNETIC WAVE INTENSITY DISPLAY
F—OUTPUT
G—FREQUENCY MODULATION
H—ELECTROMAGNETIC WAVE INTENSITY MODULATION

(57) Abstract: The present invention relates to a method for activating ordinary yeast recessive genes by employing simulated life electromagnetic wave information to make the ordinary yeast into specific yeast, wherein the specific proteins (enzymes) expressed by the specific yeast respectively have the functions to activate, regulate, correct the B cell immune genes, T cell immune genes, K cell immune genes and NK cell variant genes of low immunological competence. The specific yeast was made into biological preparation to regulate the body immune genes for reconstructing the body immune function and recovering the body health form several diseases. The present biological preparation can be used in prevention and treatment to various tumors, uraemia, hepatitis, presbyophrenia, various gastrointestinal diseases, diabetes, neural disturbance and the like, which have significant effect and no toxic or side effect.

[见续页]

WO 02/62985 A1



(57) 摘要

本发明涉及一种采用模拟生命电波信息的方法，激活普通酵母隐性基因，使普通酵母变成特异性酵母，这种特异酵母所表达的特性蛋白（酶），分别具有激活、调控、校正免疫能力低下 B 细胞免疫基因、T 细胞免疫基因、K 细胞免疫基因和 NK 细胞变异基因的功能。并使用这些特异性酵母制成了生物制剂用于调控机体免疫基因达到重建机体免疫功能的作用，使患多种疾病的机体恢复健康。本生物制剂可用于多种肿瘤、尿毒症、肝炎、老年痴呆、各种胃肠疾病、糖尿病、神经障碍等多种疾病的防治，效果显著，无毒副作用。

具有 NK 细胞免疫调节活性的酵母及其制法和应用

发明领域

本发明主要涉及一种具有 NK 细胞免疫调节活性的酵母及其制备方法
5 和用途。用该酵母制得的免疫调节剂用于患病的机体、虚弱机体免疫功能的调节，使破坏的免疫功能得到恢复，从而达到抗病、治病的目的。

现有技术描述

生物技术是当今世界科学技术研究的热门课题。许多科学家、经济学
10 家和政治家都认为 21 世纪是生物技术主导发展的世纪，是产业化的革命性技术。因此许多国家特别是发达国家都投入了大量的人力、财力攻克生物技术，企图尽快突破生物技术研究大关，揭开生命的秘密，从而创造出有效治疗和防御人类疑难病症的生物制剂。纵观世界生物技术研究，主要课题是集中在如何防治人类疑难病症方面。从 1998 年美国国家科学委员会
15 的一份报告上可以了解到，美国生物技术研究经费其中有 92% 花费在医学研究上。剖析世界生物技术研究的历史可知，众多的研究集中在人类基因的序列测定、蛋白的结构等，试图找到人类多种疾病的发病机制。这种研究花费了大量的时间，耗费了无数的资金，但得到的结果并不理想，至今也没有找到人类多种疑难杂症以及癌症准确的发病机制。各种各样的基因
20 序列得到了测定，包括人类基因组这样庞大的工程，也于 2000 年 10 月份宣告测序完成，但至今能够应用在人类疑难病症治疗上的产品十分罕见。一个基因虽然了解到了它的序列，但基因所表达酶机制、酶催化底物的机制，以及酶催化底物的活性依然是当今生物技术研究的难题，极大的限制着生物技术的发展。

25 如上所述，为什么生物技术研究处于这种不利局面呢？本发明认为关键是一个研究方法的问题。常规生物技术研究采用的是生物化学、生物分子学等方法，这些方法都是由常规的化学方法衍变过来的。化学方法基本上是研究非生命物质的化合、分解、氧化还原等变化。生物则是有生命的

物质，这些生命物质每时每分每秒都在不停地变化着，老一代死去新一代复生，交替不变。仅是在组成机体的最小单位—细胞中物质的代谢、物质的转换有序的进行着，从不会停止。当今生物技术研究把肉体这种有形的物质作为生命全部实际上是十分不完全的。本发明的研究认为，一个有生命5 的生物体最本地应由两大部分组成，一部分是看得见、摸得着的肉体，即有形物质；另一部分是常规理论认为看不见、摸不着的无形物质—“灵魂”。这里所指的“灵魂”并不是那种封建迷信所说的“幽灵”，而是存在于每一个生物体上的“生命电波”。在一个活的生命体上，这种生命电波不停的发射，当这种无形的“生命电波”失去以后，生命也就停止了，10 肉体也就成为死的物质—尸首（肉体）。当今世界的所有研究都是只研究死的物质—肉体，而从没有人研究“生命电波”。从某种意义上说肉体是一种死的物质，“生命电波”才是活的物质，肉体只是“生命电波”的宿主，即发射源。只有当肉体 and “生命电波”有机地结合在一起才能称之为生命的物质—生物。综上所述，在生命科学研究上，“生命电波”的研究15 究比肉体的研究更为重要！当然“生命电波”的研究一定要结合肉体才能是一个完整的生物研究。

近 200 年来是化学技术高度发展的时代，特别是 20 世纪后 70 年来化学、生物化学、生物工程等有了突飞猛进的发展，因而创造了数以万计的化学产品。从人类使用的工具、穿着的衣服、食用的食品、装饰用的化妆20 品以及建筑材料等都是化学产品；化学品使传统的农业变成了化学农业，无论是使用的肥料，还是防病、杀虫、除草都是化学物质；为了获得高产使用化学物质刺激作物快速生长也是使用的化学物质。在医学上，特别是在西方国家占据 100%的市场，就是在中国也占领了近 82%的市场。大量的抗生素、激素、干扰素等各种各样的化学药物无处不在。今日的世界无25 论是在自己的家庭还是繁华的世界每一个角落，到处是琳琅满目的化学品。近年来许多科学家认为，化学工业为人类带来了高度的发展，但也同时给人类带来了健康的危害。这是因为大量的化学品造成了环境的污染，无论是人类食用的食物，还是饮用的水，都不同程度地受到化学品的污染；大

量的化学药物，特别是抗生素类、干扰素类、激素类药物危害更大；就连从来不使用抗生素，甚至从来不吃药的人也无法逃避从农产品、肉、蛋、奶以及它们的制品带来的化学物质对身体的危害。人类摄取了大量的化学物质，造成了奇奇怪怪的疑难病症无法医治。这是因为各种各样的化学物质造成了人体免疫系统的损伤、降低甚至缺失。另外大量的各种各样的化学物质对环境的污染，诱发了各种各样的病原微生物，从近年来世界上各种各样的报道可知，当今病原微生物无论从品种上，还是从致病能力上都有了很大的提高。因此造成了人类的疾病越来越多，越来越奇怪，越来越难治疗。比如各种各样的肿瘤、肝炎、糖尿病、尿毒症等十分普遍，但时至今日还没有一个有效的医治办法。纵观世界各种各样的研究机构，大量的科学家从事医学的研究，各国政府投入了无数的资金支持医学的研究，各种各样的化学药物推向市场，然而不但传统的疾病没有得到有效地控制，反而新产生了各种各样的奇难杂症不停的向医学界发出挑战！如艾滋病、疯牛病等相继出台，医学界束手无策！

综上所述，按照世界目前的医学研究方向和方法发展下去，不但传统的疾病得不到有效地预防与治疗，反而还会诱发更多、更新、更难治疗的疾病。如何找到一个有效的、安全的控制疾病的办法是当今世界急不可待的大事。

有资料表明，当今世界上使用的抗生素多达 100 多种，激素也有几十种，各种化学物质更是不计其数。这些抗生素、激素不但在人体上使用，而且在牲畜养殖、家禽养殖、水产养殖等产业上的使用更为广泛，并成为饲料中必不可少的成分，无论是品种还是数量都远远超过在人身上的使用量。因此人类食用的肉、蛋、奶以及制品中残留着大量的抗生素、激素和多种化学药物，间接地进入人体残害着人类的机体，不但造成了人体免疫力的下降，而且增强了人体的抗药性。众所周知，50 年代甚至 70 年代，人类患了病，仅注射 1—2 次抗生素就会治愈，可到了今天，使用满货架子的抗生素未免能奏效，甚至越发严重。回顾抗生素刚刚出世的时代非常有效，一种抗生素刚刚出世，很快在医学界广泛得到应用。随着人类对这种

5 抗生素的使用，发现不但这种抗生素不再那么灵验，反而诱发了新的疾病、新的病原微生物，于是人类就又开始了新的抗生素的研究与应用，当这种新的抗生素又不那么灵验时，更新的抗生素研究与开发开始了。抗生素的研究与开发就是按照这种规律发展至今形成了庞大的抗生素系列，同时人类各种各样的疑难杂症，也就随之得到蔓延。这种恶性的循环规律引起了许多国家的关注，有的国家对抗生素的使用变得十分慎重，然而食物和水带给人类的抗生素是很难回避的，致使许多人采取喝矿泉水、吃有机食品这种消极的办法解除化学物质的危害。

10 上述这种状况充分说明人类免疫功能已有了较大程度的伤害，如何快速、有效的解除这种状况的困扰是当务之急。

发明目的

本发明的目的为解决上述问题而提供一种用特定的无线电波处理酵母细胞以制备具有NK细胞免疫调节活性的酵母细胞的方法。

15 本发明的另一个目的是提供用上述方法获得的酵母细胞。

本发明进一步的目的是提供含有上述酵母细胞作为活性成分的免疫调节剂。

本发明再进一步的目的是提供上述酵母细胞在制备用于调节、矫正或激活NK细胞的药物以及治疗肿瘤的药物中的用途。

20

发明简述

25 本发明采用“生命电波”激活酵母“隐性功能基因”，使这些酵母变成具有激活人体免疫细胞功能的特异性酵母。再经过本发明“生命电波”条件下的驯化培养，然后制成高效调节人体免疫功能的生物制剂，并将这些生物制剂应用到人体免疫调节上，使免疫功能下降、损伤或缺失的机体快速恢复，从而达到治病防病之目的。

本发明之所以能够成功地获得用于多种疾病防治的免疫调节剂生物制品，关键是采用与常规生物技术研究完全不同的研究方法。本发明所涉及

的研究方法，是结合了生物体的生命真谛，既研究生命体的肉体特性，又要研究生命体活物质“生命电波”。本发明研究“生命电波”能够寄宿在肉体上的必要条件，同时研究“生命电波”对宿主物质的组成的调控。通过这种研究成功的获得了世界首创的生物免疫调节剂。实验表明，这种免疫调节剂具有安全、无毒副作用、效果显著。对那些由于患多种肿瘤、肾功能衰竭、尿毒症、乙型肝炎等疾病，造成的免疫功能减弱、损伤或缺失，具有快速恢复的功能，从而使患病的机体得到康复。本发明生物制剂的特点是：

通过大量的实验表明，本发明生物制剂，具有以下特性：

- 10 1. 采用模拟免疫基因特异性“生命电波”的人工电波方法，与传统生命科学研究完全不同；
2. 创造出全面调节机体免疫力的生命活性物质；
3. 这种生命活性物质具有快速调节机体免疫功能的作用；
4. 通过免疫功能的快速调节，达到患有多种癌症、尿毒症、肝炎、糖尿病等患者快速恢复机体健康之效能；
- 15 5. 本发明生物制剂不是中药，也不是西药，更不是抗生素类、干扰素类、激素类等，而是一种安全无毒副作用的生物制剂；
6. 具有极强的专一性，对于不同疾患造成的免疫力下降、损伤或缺失必须使用不同的生物免疫调节剂。

20

附图说明

图 1 是基因结构的示意图。

图 2 是人工模拟“生命电波”激活酵母“隐性功能基因”方法示意图。

图 3 是特异性酵母环境适应性培养的示意图。

25 图 4 是激活后特异性酵母扩大培养工艺的示意图。

图 5 是特异性酵母液的浓缩工艺的示意图。

图 6 是成品冷却包装工艺示意图。

发明描述

各种各样的疾病是人类健康的大敌，也是造成人类死亡的最主要因素。大量的研究表明，无论是什么样的疾病都与机体的免疫力有关。当机体的免疫力较强时各种疾病都不会发生。但随着年龄的增加和机体的老化，特别是各种各样的化学物质、各种各样的抗生素、激素等造成机体免疫力细胞的损伤，免疫细胞代谢紊乱，免疫基因不能正常的表达，致使免疫功能衰退。免疫力衰退的机体很容易受到各种各样病原菌的侵袭，也会受到各种各样有毒物质的危害，从而造成各种各样的疾病发生。机体免疫力的下降按照常规的检测方法是很难发现的。因为常规方法检测机体会发现机体内的 B、T、K、NK 等免疫细胞数量正常。本发明的研究认为，免疫细胞的数量正常与否只能是机体免疫功能指标之一，但并不表示免疫基因表达正常，更不能标志免疫酶的性质、活性也是正常的。这就是说免疫细胞的免疫功能不应只是 B、T、K、NK 细胞数量的多少，还要辨认这些免疫细胞中的免疫基因所表达免疫酶的性质是否正常，免疫酶的催化活性是否足够。本发明认为，免疫基因所表达的免疫酶不但数量要足，而且必须有足够的催化效力，也就是说，当机体 B、T、K、NK 细胞数量正常时，所表达的免疫酶数量并不一定足量，当免疫酶数量足够时，也并不一定有良好的催化活性。免疫基因和其他基因一样，按照其作用分为两大部分（见图 1），图的左侧部分为免疫基因的启动子部分，其中包括启动基因。启动基因担负着启动右侧功能结构基因表达免疫酶的数量、表达的时间等功能。图的右侧称为功能结构基因部分，其中主要是结构基因，结构基因决定了该基因所表达酶的结构，即酶性质，也就是说只要结构基因碱基序列和基因链的卷曲结构不变，其所表达酶结构及性质就不会发生变化，但其所表达的数量和表达时间、何时表达酶量少一些、何时表达酶量多一些、何时表达酶到最高峰等，完全受启动基因的控制。当 B、T、K、NK 免疫细胞的免疫基因的启动子部分受到各种有害因子的影响，造成表达异常时，直接影响到功能结构基因所表达免疫酶数量、表达时间曲线。当免疫基因的功能结构基因部分受到外因子干扰，造成其碱基或卷曲形状发生变化时，会影

响功能结构基因所表达免疫酶的性质或者是活性，机体的免疫力已经遭到了严重破坏，但常规的检测并不容易发现。另外当免疫基因所表达的免疫酶数量、性质不变时，免疫基因对有害因子影响，作出表达反应的时间是否相一致也是十分重要的，这就是所说的免疫基因应答能力，当免疫基因的应答能力下降，或应答时间提前或滞后时都会表现出免疫力的下降，造成机体患病。为什么机体的 B、T、K、NK 细胞的免疫基因会有上述问题呢？本发明的研究发现许多带有阴离子或阳离子的“自由基”、各种各样的病原微生物所产生的毒素类物质，以及多种神经障碍、各种辐射源等都可能造成 B、T、K、NK 免疫细胞基因变异或“僵化”，对这种僵化的基因，在本发明中称之为“隐性基因”，这种隐性基因不能及时、准确的表达，对外界病原微生物和多种致病因子不能及时的抵御，造成机体患病。

本发明多年的研究发现，各种免疫基因在各自的生命活动过程中，都会发射出一种特异性的“生命电波”，不同的免疫基因所发射的“生命电波”不同，免疫基因靠这些“生命电波”传输免疫信息对侵害机体的有害因子作出免疫反应。因此当免疫基因发生变化时，所发射的“生命电波”就会发生变化，那管是一种微小的变化都会造成“生命电波”的变化。本发明的关键在于发现了基因的“生命电波”会因有害因子造成改变，但也可以在带有有益电波物质的调控下恢复正常，被有害因子造成“僵化”的“隐性基因”，可使用有益因子激活。可用于本发明的电波的频率范围是 1800MHz - 56000MHz，优选 3500 - 36000MHz，更优选 7000 - 11500MHz。电波的强度为 115 - 445mv/cm。

本发明根据以上原理，采用模拟机体免疫基因“生命电波”的人工电波，创造一种“有益因子”，并将这种有益因子物质制成生物制剂，使用这种生物制剂来调控变异的免疫基因，从而达到调节免疫功能的作用。通过调控免疫功能，使机体增强抵御疾病的能力，使患多种病患的机体快速恢复。

本发明通过大量的研究认为，要通过人工模拟“生命电波”获得一种能够调控免疫基因的活性物质，是一件十分困难的工作。本发明经过 20 多年的探索发现，自然界无处不在的微生物中人类利用的仅是“九牛一毛”，

这是因为人们对微生物基因功能了解得不多。时至今日，人类所了解全部基因组成和功能的微生物仅有 26 种，而且这 26 种微生物也仅是结构简单的种类，对于复杂的真核微生物人类还不了解。特别是人类经常使用的酵母微生物中，含有大量没被利用的基因，这些基因由于长期得不到应用已经变成了“僵化基因”，本发明称这些“僵化基因”为“隐性功能基因”。更为重要的是在这些“隐性功能基因”中存在着本发明所需要的，能够用于调控人类机体免疫功能的有益蛋白类物质。本发明就是利用人工模拟生命电波的方法激活酵母中能够表达调控机体免疫功能蛋白物质的“隐性功能基因”实现的。

10 本发明采用模拟生命电波方法激活酵母“隐性功能基因”，培育出了 4 种分别激活 B、T、K、NK 4 种免疫细胞的特异性酵母，制成了调控机体免疫功能的生物制剂。本发明为了使这 4 种特异性的酵母在食用后顺利通过胃，并保证在胃中不会被大量的酸性物质杀死，本发明又将这 4 种特异性酵母做了耐 $\text{pH} \leq 2.5$ 的条件培养。培养后的酵母细胞将会顺利通过胃器官到达小肠。在小肠多种酶的作用下特异性酵母细胞被裂解，释放出包装在细胞内的特异性免疫功能调节酶（蛋白）。这些特异性免疫功能调节酶“专一性”的激活、调控机体相对应免疫细胞中免疫基因的表达。本发明所涉及的 4 种机体免疫调节特异性酵母，由于它们都是人类长期食用或生产上使用的微生物，不会产生任何毒副作用。这些特异性酵母细胞内释放出的活性酶，具有瞬间激活、调节机体内免疫基因正确、高效表达的作用，然后将会随着机体内的代谢很快失掉活性转变成机体的营养物质被吸收，不会造成在机体中内残留。

本发明所涉及的调控机体免疫功能生物制剂的作用机理简要说明如下：调控机体免疫功能生物制剂中的核心成分是 4 种具有分别激活机体 B、T、K、NK “隐性免疫基因”的蛋白，这 4 种蛋白又分别包藏在 4 种特异性酵母中。这 4 种酵母就是本发明采用人工模拟“生命电波”激活的微生物，在本发明中称这 4 种被模拟“生命电波”激活“隐性功能基因”的酵母为特异性酵母。这 4 种特异性酵母细胞中分别含有被激活免疫调节功能

酶，这些免疫调节功能酶专一性地激活机体内免疫 B 细胞、免疫 T 细胞、免疫 T 细胞和免疫 NK 细胞免疫基因恢复、活化，使这些免疫基因正确高效表达。这些特异性的酵母是通过各自特异性的模拟“生命电波”条件培养出来的。本发明所使用的激活机体 B 细胞免疫功能特异性酵母，所使用
5 的人工模拟电波频率和电波强度，是由免疫 B 细胞的免疫基因特异性“生命电波”决定的；激活机体 T 细胞免疫功能特异性酵母，所使用的人工模拟电波频率和电波强度，是由免疫 T 细胞的免疫基因特异性“生命电波”决定的；激活机体 K 细胞免疫功能特异性酵母，所使用的人工模拟电波频率和电波强度，是由免疫 K 细胞的免疫基因特异性“生命电波”决定的；
10 激活机体 NK 细胞免疫功能特异性酵母，所使用的人工模拟电波频率和电波强度，是由免疫 NK 细胞的免疫基因特异性“生命电波”决定的。这 4 种不同功能的特异性酵母，经过隐性基因激活、模拟“生命电波”条件培养，使细胞内产生了具有激活、调控上述 4 种免疫基因的活性酶（蛋白）。使用这 4 种特异性酵母制剂时，特异性酵母进入机体的小肠内，在小肠多
15 种酶的作用下细胞裂解，裂解后的细胞释放出免疫基因激活调控酶。这些免疫基因激活调控酶立即被小肠吸收进入血液，通过血液分别运送到 4 种免疫细胞内，从而达到激活、调控 4 种免疫基因正确表达提高免疫力的目的。

本发明免疫功能生物调节剂，是通过以下两个方面的步骤实现的。第一个步骤是采用特异性的模拟“生命电波”激活普通酵母，使这些酵母变成具有调节 B、T、K、NK 细胞免疫功能的特异性酵母，并将这些酵母作耐低 pH 条件培养；第二步是在特异模拟生命电波条件下，扩大培育这些特异性酵母，然后将这些特异性酵母制成调控免疫功能使用的生物制品。这两个方面的实施过程是通过以下的步骤实现的。

25

一、激活酵母功能“隐性基因”

在以上的叙述中，说明了本发明采用模拟“生命电波”方法激活普通酵母，使酵母中隐性功能基因复活，分别表达出具有激活、调控 B 细胞免

疫基因、T 细胞免疫基因、K 细胞免疫基因和 NK 细胞免疫基因功能的蛋白。众所周知，普通酵母是一类发酵淀粉、糖类、蛋白类等多种物质的发酵菌，多用于造酒、制作面包、制造各种食品、制造医药及其多种产品的菌种，虽然酵母菌的品种繁多，功能各异，但从没有人利用酵母所表达的特异性蛋白，分别激活、调节 B、T、K、NK 免疫基因功能，当然这些酵母细胞在没有使用本发明专利之方法进行隐性基因激活之前是不具备上述功能的。

(一) 激活用于调节 NK 细胞免疫功能基因酵母“隐性功能基因”的方法步骤：

大量的基因技术研究证明，一个完整 NK 细胞免疫功能基因由两大部分组成（见图 1），一部分为 NK 细胞免疫功能基因的启动基因，另一部分为 NK 细胞免疫功能基因的结构基因。NK 细胞免疫功能基因的结构基因决定了它所表达免疫酶的性质；NK 细胞免疫功能基因的启动基因控制 NK 细胞免疫功能基因的结构基因所表达免疫酶的数量、免疫活性和免疫应答能力，即免疫酶的效价。因此，要保持 NK 细胞免疫功能基因所表达酶的性质不变，必须设法保持 NK 细胞免疫功能基因的结构基因 DNA 序列不变；要达到 NK 细胞免疫功能基因的结构基因高效表达，并保持所表达免疫酶最佳免疫活性和及时的免疫应答能力，必须设法使 NK 细胞免疫功能基因的启动基因高效启动。本发明通过人工模拟“生命电波”方法，激活酵母“隐性功能基因”，获得具有表达调控 NK 细胞免疫功能基因蛋白的特异性酵母。

参阅图 2，本发明所涉及采用人工模拟“生命电波”激活酵母“隐性功能基因”的方法步骤如下：

1. 按照表 1 的成分配制培养基，并灭菌处理。
2. 选择适当的酵母种类（可选择酵母见表 3），按照活酵母细胞/培养基 $\geq 1 \times 10^8$ 个/1000ml 的比例，注入图 2 所示容器内的培养基中。
3. 保持容器中的温度在 $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 之间，培养 24-56 小时。

4. 打开图 2 所示的电波发射仪, 将输出电波频率调节到 7300 - 10800MHz 范围内。

5. 将电波发射仪输出电磁场强度调节到: 115 - 445mv/cm 范围内。

6. 将装有酵母培养液的培养瓶, 按照图 2 所示的模式安装到接收机放大
5 大器输出端, 将接收频率调节到与发射仪所发射频率相一致的频点上。同时调节发射仪和接收仪之间的距离为 $100 \pm 20\text{cm}$, 并根据所确定的距离按照 115 - 445mv/cm 要求计算出发射机的输出电波强度 {如距离为 100cm, 其发射机的输出电波强度为: $(115 - 445\text{mv/cm}) \times 100 = 11.5 - 44.5\text{v}$ }。

7. 在上述条件下, 并保持 $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 的温度条件, 激活 42-72 小时。

10 8. 经以上条件激活后酵母细胞, 然后采用真空冷冻干燥的方法制成安瓿或制成粉剂保存。

二. 特异性酵母耐酸 (耐低 pH) 的驯化

以上说明了本发明采用人工模拟“生命电波”的方法, 分别激活酵母
15 不同“隐性功能基因”, 获得 4 种分别用于激活、调控 B 细胞免疫基因、T 细胞免疫基因、K 细胞免疫基因和 NK 细胞免疫基因功能的特异性酵母。但这 4 种特异性酵母还不能直接用于调控各种免疫基因, 这是因为它们还不能适应机体内的环境。众所周知, 机体内是一个十分复杂的环境, 而且各种环境因子每时每刻都在变化着。当这 4 种特异性的酵母通过口腔、胃
20 进入小肠的途径时, 很难保障其细胞的完整性, 更难保障酵母细胞内目的酶的活性, 因此保障酵母细胞活性是十分关键的。本发明采用了对 4 种特异性酵母的环境因子驯化培养, 驯化培养方法步骤如下:

本发明 4 种功能微生物的环境适应性驯化是通过如图 3 所示的方法实现的:

25 参阅图 3, 本发明 4 种特异性酵母环境适应性驯化的方法步骤分别说明如下:

(一) 驯化调控 NK 细胞免疫基因的特异性酵母步骤

1. 按照表 2 的方法配置好培养基, 并灭菌处理。

2.取步骤 1 中的培养基 1000ml 注入到图 3 的容器中。

3.取调控 NK 细胞的特异性酵母液 10ml (酵母液活细胞含量 $\geq 1 \times 10^8$ 个/ml), 注入图 3 所示的容器中。

4.打开如图 3 所示的电波发生器, 并调节到调控 NK 细胞免疫基因的
5 特异性酵母专一性频率 7300 - 10800MHz 上。

5.调节如图 3 所示的电波输出电压为 5-10mv/ml (1000ml 培养基所使用的电波强度为 5-10v)。

6.保持上述电波频率和电波强度不变, 在 $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 的温度条件培养 48 - 96 小时后, 分离保存在 $0 - 4^\circ\text{C}$ 的条件下备用。

10

三. 本发明免疫功能调节剂的制法

本发明所涉及的特异性酵母经过上述方法获得后仅是获得了种子, 要制成大量的本发明生物制剂, 必须有足量的特异性酵母, 因此需要扩大培养。特异性酵母培养是通过以下方法步骤实现的:

15 A、调节 NK 细胞免疫基因功能的特异性酵母培养工艺

本发明所涉及调节 NK 细胞免疫功能的特异性酵母培养工艺工程正如图 4 所示。

参阅本发明说明书图 4, 本发明所涉及的调节 NK 细胞免疫功能的特异性酵母培养工艺步骤如下:

20 1.按照表 4 的成分配制培养基, 并经灭菌处理后, 分别注入到图 4 的 A、B、C 罐中。

2.将经人工模拟生命电波方法激活, 并经耐受低 pH (小于 pH2.5) 的培养所获得的调节 NK 细胞免疫功能的特异性酵母, 输入到图 4 所示的种子罐 A 中, 作为种子液。然后按照一定的比例将 A 罐种子液注入到 B 罐
25 的培养基中扩大培养, 注入的比例为: A 种子液/B 培养液=5ml/1000ml。

3.调节电波发生器, 使其输出生物电波为 7300 - 10800MHz, 并同时按照 0.5-1.0v/L 的要求计算, 设定电波强度 (如假设 B 罐中培养液的数量为 50L, 单磁波强度应为: $0.5-1.0\text{v/L} \times 50\text{L}=25\text{v}-50\text{v}$)。

4.保持上述电波频率和电波强度不变情况下, $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 56-72 小时。

5.当 B 罐中调节 NK 细胞免疫基因的特异性酵母活细胞达到 20 亿个/ml 时, 将 B 罐酵母液输入 C 罐中, 准备输送到下道工艺。

5

以下将通过具体的实施例对本发明的实施方案进行具体描述。虽然在每一个实施例中仅涉及一种具体的酵母菌, 但发明人通过实验, 发现用其他的酵母菌菌株也可以获得相同的结果。

10 实施例的描述

实施例 1: 激活用于调控 NK 细胞免疫功能基因酵母“隐性功能基因”的方法举例如下:

- 1.按照表 1 的成分配制培养基 1000-2000ml, 并灭菌处理。
- 2.选择 IFFI1048 酵母种类, 按照活 IFFI1048 细胞/培养基 $\geq 1 \times 10^8$ 个 /1000ml 的比例, 注入图 2 所示容器内的培养基中。
- 3.保持容器中的温度在 $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 之间, 培养 24-56 小时。
- 4.打开图 2 所示的电波发射仪, 将输出电波频率调节到 7300 - 10800MHz 范围内。
- 5.将电波发射仪输出电磁场强度调节到: 11.5-44.5V(以距离为 100cm 为例)范围内。
- 6.将装有酵母 IFFI1048 培养液的培养瓶, 按照图 2 所示的模式安装到接收机放大器输出端, 将接收频率与发射仪的发射频率调节到相同的 7300 - 10800MHz 范围内。同时调节发生仪和接收仪之间的距离为 100cm。
- 7.在上述条件下, 并保持 $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 的温度条件, 激活 42 - 72 小时。
- 8.经以上条件激活后 IFFI1048 酵母细胞, 采用真空冷冻干燥的方法制成安瓿或制成粉剂保存。

25

实施例 2. 免疫调节剂对 180 腹水瘤的抑制效果

- a. 取 wates 大鼠 60 只, 分成 A、B、C 共 3 组, 每组 20 只大鼠。A 组为实验组, B 组为使用环磷酰胺对照组, C 为空白对照组。
- b. 采用 180 腹水瘤, 分别接种各组大白鼠。
- c. 从接种后的第二天开始, A 组给本生物制剂液(特异性酵母细胞 $\geq 1 \times 10^8$ 个/ml), 剂量为 0.6ml/kg; B 组给环磷酰胺, 剂量为 20ug/kg; C 组给生理盐水 0.6ml/kg。每天一次。
- d. 七天后解剖检测腹水瘤的大小, 如下表:

| 数据 组别 | 瘤重 | 比例% | 说明 |
|----------|-----------------|-----------------|-----|
| C 组 | 22g \pm 4.2/只 | 100% (以此为 100%) | 平均值 |
| B 组 | 16g \pm 3.7/只 | - 27.2% | 平均值 |
| A 组 | 3g \pm 0.3/只 | - 86.4% | 平均值 |

10 实施例 3. 免疫调节剂对 U-14 实体瘤的抑制效果

- a. 取 wates 大鼠 90 只, 分成 A、B、C 共 3 组, 每组 30 只大鼠。A 组为实验组, B 组为使用环磷酰胺对照组, C 为空白对照组。
- b. 采用 U-14 实体瘤, 分别接种各组大白鼠。
- c. 从接种后的第二天开始, A 组给本生物制剂液(特异性酵母细胞 $\geq 1 \times 10^8$ 个/ml), 剂量为 0.6ml/kg; B 组给环磷酰胺, 剂量为 20ug/kg; C 组给生理盐水 0.6ml/kg。每天一次。
- d. 服用 14 天后解剖检测腹水瘤的大小, 如下表:

| 数据 组别 | 瘤重 | 比例% | 说明 |
|----------|-----------------|-----------------|-----|
| C 组 | 19g \pm 2.2/只 | 100% (以此为 100%) | 平均值 |
| B 组 | 17g \pm 1.6/只 | - 10.5% | 平均值 |
| A 组 | 2g \pm 0.2/只 | - 89.5% | 平均值 |

表 1. 激活调控 (B、T、K、NK) 细胞所用酵母“隐性功能基因”
培养基成分表

| 培养基成分 | 数量 |
|----------------------|------------|
| 甘露醇 | 16g |
| K_2HPO_4 | 0.25g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2g |
| NaCl | 0.22g |
| $CaSO_4 \cdot H_2O$ | 0.5g |
| $CaCO_3$ | 6.0g |
| Urea | 0.2—0.5g |
| 血清 | 100--300ml |
| 蒸馏水 | 700--900mL |

5 表 2. 环境条件适应性培养基成分表 (以 1000ml 为例)

| 培养基成分 | 数量 | 说明 |
|----------------------|--------|----------------------------------|
| 酸枣汁 | 300ml | 用干酸枣/水=1g/5ml 比例制成的清液 |
| 山定子汁 | 500ml | 用干山定子/水=1g/5ml 比例制成的清液 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0.25g | |
| K_2HPO_4 | 0.2g | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.22g | |
| NaCl | 0.5g | |
| $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.3g | |
| $CaCO_3$ | 3.0g | |
| 激活后的特异性 酵母培养液 | 各 20ml | 含活酵母细胞 $\geq 1 \times 10^8$ 个/ml |

表 3. 本专利所涉及的微生物种类
(但不仅限于本表所列微生物)

| | | | | |
|----------|---|----------|----------|----------|
| 所属属类-01 | Saccharomyces cerevisiae Hansen 酿酒酵母 | | | |
| 原用途-01 | 酿酒、食用和食品制造 | | | |
| ACCC2034 | ACCC2035 | ACCC2036 | ACCC2037 | ACCC2038 |
| ACCC2039 | ACCC2040 | ACCC2041 | ACCC2042 | AS2.1 |
| AS2.4 | AS2.11 | AS2.14 | AS2.16 | AS2.56 |
| AS2.69 | AS2.70 | AS2.93 | AS2.98 | AS2.101 |
| AS2.109 | AS2.110 | AS2.112 | AS2.139 | AS2.173 |
| AS2.174 | AS2.182 | AS2.196 | AS2.242 | AS2.336 |
| AS2.346 | AS2.369 | AS2.374 | AS2.375 | AS2.379 |
| AS2.380 | AS2.382 | AS2.390 | AS2.393 | AS2.395 |
| AS2.396 | AS2.397 | AS2.398 | AS2.399 | AS2.400 |
| AS2.406 | AS2.408 | AS2.409 | AS2.413 | AS2.414 |
| AS2.415 | AS2.416 | AS2.422 | AS2.423 | AS2.430 |
| AS2.431 | AS2.432 | AS2.451 | AS2.452 | AS2.453 |
| AS2.458 | AS2.460 | AS2.463 | AS2.467 | AS2.486 |
| AS2.501 | AS2.502 | AS2.503 | AS2.504 | AS2.516 |
| AS2.535 | AS2.536 | AS2.558 | AS2.560 | AS2.561 |
| AS2.562 | AS2.576 | AS2.593 | AS2.594 | AS2.614 |
| AS2.620 | AS2.628 | AS2.631 | AS2.666 | AS2.982 |
| AS2.1190 | AS2.1364 | AS2.1396 | IFFI1001 | IFFI1002 |
| IFFI1005 | IFFI1006 | IFFI1008 | IFFI1009 | IFFI1010 |
| IFFI1012 | IFFI1021 | IFFI1027 | IFFI1037 | IFFI1042 |
| IFFI1043 | IFFI1045 | IFFI1048 | IFFI1049 | IFFI1050 |
| IFFI1052 | IFFI1059 | IFFI1060 | IFFI1063 | IFFI1202 |
| IFFI1203 | IFFI1206 | IFFI1209 | IFFI1210 | IFFI1211 |

| | | | | |
|-----------|---|----------|----------|-----------|
| IFFI1212 | IFFI1213 | IFFI1214 | IFFI1215 | IFFI1220 |
| IFFI1221 | IFFI1224 | IFFI1247 | IFFI1248 | IFFI1251 |
| IFFI1270 | IFFI1277 | IFFI1287 | IFFI1289 | IFFI1290 |
| IFFI1291 | IFFI1292 | IFFI1293 | IFFI1297 | IFFI12300 |
| IFFI1301 | IFFI1302 | IFFI1307 | IFFI1308 | IFFI1309 |
| IFFI1310 | IFFI1311 | IFFI1335 | IFFI1336 | IFFI1337 |
| IFFI1338 | IFFI1339 | IFFI1340 | IFFI1345 | IFFI1348 |
| IFFI 1396 | IFFI1397 | IFFI1399 | IFFI1411 | IFFI1413 |
| 所属属类-02 | Saccharomyces cerevisiae Hansen Var. ellipsoideus (Hansen) Dekker 椭圆酿酒酵母 | | | |
| 原用途-02 | 酿酒、食用和食品制造 | | | |
| ACCC2043 | AS2.2 | AS2.3 | AS2.8 | AS2.53 |
| AS2.163 | AS2.168 | AS2.483 | AS2.541 | AS2.559 |
| AS2.606 | AS2.607 | AS2.611 | AS2.612 | |
| | | | | |
| 所属属类-03 | Saccharomyces chevalieri Guilliermond 薛瓦酵母 | | | |
| 原用途-03 | 酿酒、食用和食品制造 | | | |
| AS2.131 | AS2.213 | | | |
| 所属属类-04 | Saccharomyces delbrueckii 德尔布酵母 | | | |
| 原用途-04 | 食品发酵 | | | |
| AS2.285 | | | | |
| 所属属类-05 | Saccharomyces delbrueckii Lindner ver.mongolicus (Saito) Lodder et van Rij 蒙古德尔布酵母 | | | |
| 原用途-05 | 食品发酵 | | | |
| AS2.209 | AS2.1157 | | | |
| 所属属类-06 | Saccharomyces exiguous Hansen 少孢酵母 | | | |

| | | | | |
|---------|--|---------|--|--|
| 原用途-06 | 食品发酵 | | | |
| AS2.349 | AS2.1158 | | | |
| 所属属类-07 | Saccharomyces fermentati (Saito) Lodder et van Rij 发酵性酵母 | | | |
| 原用途-07 | 食品发酵 | | | |
| AS2.286 | AS2.343 | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| 所属属类-08 | Saccharomyces Logos van laer et Denamur ex Jorgensen 洛格酵母 | | | |
| 原用途-08 | 酿造葡萄酒类、食品发酵等功能 | | | |
| AS2.156 | AS2.327 | AS2.335 | | |
| 所属属类-08 | Saccharomyces mellis (Fabian et Quinet) Lodder et kreger van Rij 蜂蜜酵母 | | | |
| 原用途-08 | 用糖类、淀粉类发酵 | | | |
| AS2.195 | | | | |
| 所属属类-09 | Saccharomyces mellis Microellipsoides Osterwalder 小椭圆酵母 | | | |
| 原用途-09 | 用糖类、淀粉类发酵 | | | |
| AS2.699 | | | | |
| 所属属类-10 | Saccharomyces oviformis Osteralder 卵形酵母 | | | |
| 原用途-10 | 用糖类、淀粉类发酵 | | | |
| AS2.100 | | | | |
| 所属属类-11 | Saccharomyces rosei (Guilliermond) Lodder et Kreger van Rij 罗斯酵母 | | | |
| 原用途-11 | 用糖类、淀粉类发酵 | | | |
| AS2.287 | | | | |

| | | | | |
|----------|--|----------|----------|----------|
| | | | | |
| | | | | |
| 所属属类-12 | Saccharomyces rouxii Boutroux 鲁氏酵母 | | | |
| 原用途-12 | 用糖类、淀粉类发酵, 制造食用酱、酱油等 | | | |
| AS2.178 | AS2.180 | AS2.370 | AS2.371 | |
| 所属属类-13 | Saccharomyces Sake Yabe 清酒酵母 | | | |
| 原用途-13 | 用糖类、淀粉类发酵 | | | |
| ACCC2045 | | | | |
| 所属属类-14 | Candida arborea 树状假丝酵母 | | | |
| 原用途-14 | 用于饲料、氨基酸类制造、纤维素、淀粉、糖类、蛋白发酵等。 | | | |
| AS2.566 | | | | |
| 所属属类-15 | Candida lambica (Lindner et Genoud) van. Uden et Buckley; 朗比克假丝酵母 | | | |
| 原用途-15 | 用于高温下产酯, 制造食用香精等 | | | |
| AS2.1182 | | | | |
| 所属属类-16 | Candida Krusei (Castellani) Berkhout 克鲁斯酵母 | | | |
| 原用途-16 | 用于酿酒、制造饲料、氨基酸类、蛋白等。 | | | |
| AS2.1045 | | | | |
| | | | | |
| 所属属类-17 | Candida lipolytica (Harrison) Diddens et Lodder 解脂假丝酵母 | | | |
| 原用途-17 | 用于石油脱蜡、制造有机酸类物质 | | | |
| AS2.1207 | AS2.1216 | AS2.1220 | AS2.1379 | AS2.1398 |

| | | | | |
|----------|---|----------|----------|----------|
| AS2.1399 | AS2.1400 | | | |
| 所属属类-17 | Candida parapsilosis (Ashford) Langeron et Talice Var. intermedia Van Rij et Verona 中型平滑假丝酵母 | | | |
| 原用途-17 | 利用糖类、淀粉类发酵制造饲料 | | | |
| AS2.491 | | | | |
| 所属属类-18 | Candida parapsilosis (Ashford) Langeron et Talice 近平滑假丝酵母 | | | |
| 原用途-18 | 利用戊糖类水解液制造饲料 | | | |
| AS2.590 | | | | |
| 所属属类-19 | Candida pulcherriman (Lindner) Windisch 铁红酵母 | | | |
| 原用途-19 | 刺激生长 | | | |
| AS2.492 | | | | |
| 所属属类-20 | Candida rugosa (Anderson) Diddens et Lodder 皱褶假丝酵母 | | | |
| 原用途-20 | 石油脱蜡、生产有机酸等 | | | |
| AS2.511 | AS2.1367 | AS2.1369 | AS2.1372 | AS2.1373 |
| AS2.1377 | AS2.1378 | AS2.1384 | | |
| 所属属类-21 | Candida tropicalis (Castellani) Berkhout 热带假丝酵母 | | | |
| 原用途-21 | 糖类发酵; 纤维素、半纤维素发酵; 纸浆业发酵; 亚硫酸烟叶发酵; 饲料制造; 酵母膏、麦角固醇制造等。 | | | |
| ACCC2004 | ACCC2005 | ACCC2006 | AS2.164 | AS2.402 |
| AS2.564 | AS2.565 | AS2.567 | AS2.568 | AS2.617 |
| AS2.637 | AS2.1387 | AS2.1397 | | |
| 所属属类-22 | Candida utilis Henneberg Lodder et Kreger Van Rij 产朊假丝酵母 | | | |
| 原用途-22 | 食用和饲料制造 | | | |

| | | | | |
|----------|---|----------|----------|----------|
| AS2.120 | AS2.281 | AS2.1180 | | |
| 所属属类-23 | Crebrothecium ashbyii (Guilliermond) Routein=Eremothecium ashbyii Guilliermond 阿舒假囊酵母 | | | |
| 原用途-23 | 用于核黄素制造等 | | | |
| AS2.481 | AS2.482 | AS2.1197 | | |
| 所属属类-24 | Geotrichum candidum Link 白地霉 | | | |
| 原用途-24 | 饲料制造; | | | |
| ACCC2016 | AS2.361 | AS2.498 | AS2.616 | AS2.1035 |
| AS2.1062 | AS2.1080 | AS2.1132 | AS2.1175 | AS2.1183 |
| | | | | |
| 所属属类-25 | Hansenula anomala(Hansen)H et P sydow 异常汉逊酵母 | | | |
| 原用途-25 | 香料制造; 提高酒类香味、食品香味等; | | | |
| ACCC2018 | AS2.294 | AS2.295 | AS2.296 | AS2.297 |
| AS2.298 | AS2.299 | AS2.300 | AS2.302 | AS2.338 |
| AS2.339 | AS2.340 | AS2.341 | AS2.470 | AS2.592 |
| AS2.641 | AS2.642 | AS2.782 | AS2.635 | AS2.794 |
| 所属属类-26 | Hansenula arabitolenes Fang 阿拉伯糖醇汉逊酵母 | | | |
| 原用途-26 | 生产阿拉伯糖醇和甘油; | | | |
| AS2.887 | | | | |
| 所属属类-27 | Hansenula jadinii (A. et R Sartory Weill et Meyer) Wickerham 杰丁汉逊酵母 | | | |
| 原用途-27 | 未查到应用的报道 | | | |
| ACCC2019 | | | | |

| | | | | |
|----------|--|---------|---------|---------|
| 所属属类-28 | Hansenula saturnus (Klocker) H et P sydow 土星汉逊酵母 | | | |
| 原用途-28 | 未查到应用的报道 | | | |
| ACCC2020 | | | | |
| 所属属类-29 | Hansenula schneegii (Weber) Dekker 施氏汉逊酵母 | | | |
| 原用途-29 | 未查到应用的报道 | | | |
| AS2.304 | | | | |
| 所属属类-30 | Hansenula subpelliculosa Bedford 亚膜汉逊酵母 | | | |
| 原用途-30 | 从多种制酒原料或糟渣中获得, 但未查到应用的报道 | | | |
| AS2.740 | AS2.760 | AS2.761 | AS2.770 | AS2.783 |
| AS2.790 | AS2.798 | AS2.866 | | |
| 所属属类-31 | Kloeckera apiculata (Reess emend. Klocker) Janke 柠檬形克勒克酵母 | | | |
| 原用途-31 | 未查到应用的报道 | | | |
| ACCC2022 | ACCC2023 | AS2.197 | AS2.496 | AS2.714 |
| ACCC2021 | AS2.711 | | | |
| 所属属类-32 | Lipomyces starkeyi Lodder et van Rij 油脂酵母 | | | |
| 原用途-32 | 未查到应用的报道 | | | |
| AS2.1390 | ACCC2024 | | | |
| 所属属类-33 | Pichia farinose (Lindner) Hansen 粉状毕赤酵母 | | | |
| 原用途-33 | 未查到应用的报道 | | | |
| ACCC2025 | ACCC2026 | AS2.86 | AS2.87 | AS2.705 |
| AS2.803 | | | | |
| | | | | |

| | | | | |
|----------|--|----------|----------|---------|
| | | | | |
| 所属属类-34 | Pichia membranaefaciens Hansen 膜醭毕赤酵母 | | | |
| 原用途-34 | 未查到应用的报道 | | | |
| ACCC2027 | AS2.89 | AS2.661 | AS2.1039 | |
| 所属属类-35 | Rhodosporidium toruloides Banno 红冬孢酵母 | | | |
| 原用途-35 | 未查到应用的报道 | | | |
| ACCC2028 | | | | |
| 所属属类-35 | Rhodotorula glutinis (Fresenius) Harrison 红酵母 | | | |
| 原用途-35 | 发酵糖类、发酵蛋白类、制造食品、调料等 | | | |
| AS2.2029 | AS2.280 | ACCC2030 | AS2.102 | AS2.107 |
| AS2.278 | AS2.499 | AS2.694 | AS2.703 | AS2.704 |
| AS2.1146 | | | | |
| 所属属类-36 | Rhodotorula minuta (Saito) Harrison 小红酵母 | | | |
| 原用途-36 | 发酵糖类、发酵蛋白类、制造食品、调料等 | | | |
| AS2.277 | | | | |
| 所属属类-37 | Rhodotorula rubra (Demme) Lodder 深红酵母 | | | |
| 原用途-37 | 发酵糖类、发酵蛋白类、制造食品、调料、饲料等 | | | |
| AS2.21 | AS2.22 | AS2.103 | AS2.105 | AS2.108 |
| AS2.140 | AS2.166 | AS2.167 | AS2.272 | AS2.279 |
| AS2.282 | ACCC2031 | | | |
| 所属属类-38 | Saccharomyces carlsbergensis Hansen 卡尔斯酵母 | | | |
| 原用途-38 | 制造食品、造酒、饲料等 | | | |

| | | | | |
|----------|--|----------|----------|----------|
| AS2.113 | ACCC2032 | ACCC2033 | AS2.312 | AS2.116 |
| AS2.118 | AS2.121 | AS2.132 | AS2.162 | AS2.189 |
| AS2.200 | AS2.216 | AS2.265 | AS2.377 | AS2.417 |
| AS2.420 | AS2.440 | AS2.441 | AS2.443 | AS2.444 |
| AS2.459 | AS2.595 | AS2.605 | AS2.638 | AS2.742 |
| AS2.745 | AS2.748 | AS2.1042 | | |
| 所属属类-39 | Saccharomyces uvarum Beijer 葡萄汁酵母 | | | |
| 原用途-39 | 制造食品、造酒、饲料等 | | | |
| IFFI1023 | IFFI1032 | IFFI1036 | IFFI1044 | IFFI1072 |
| IFFI1205 | IFFI1207 | | | |
| 所属属类-40 | Saccharomyces willianus Saccardo 威尔酵母 | | | |
| 原用途-40 | 制造食品、造酒、饲料等 | | | |
| AS2.5 | AS2.7 | AS2.119 | AS2.152 | AS2.293 |
| AS2.381 | AS2.392 | AS2.434 | AS2.614 | AS2.1189 |
| | | | | |
| 所属属类-41 | Saccharomyces sp. 酵母菌 | | | |
| 原用途-41 | 制造白兰地酒等 | | | |
| AS2.311 | | | | |
| 所属属类-42 | Saccharomycodes ludwigii Hansen 路德类酵母 | | | |
| 原用途-42 | 未见应用的报道 | | | |
| ACCC2044 | AS2.243 | AS2.508 | | |
| 所属属类-43 | Saccharomycodes sinenses Yue 中国类酵母 | | | |
| 原用途-43 | 未见应用的报道 | | | |

| | | | | |
|----------|--|----------|----------|----------|
| AS2.1395 | | | | |
| 所属属类-44 | Schizosaccharomyces octosporus Beijerinck 八孢裂殖酵母 | | | |
| 原用途-44 | 没见应用的报道 | | | |
| ACCC2046 | AS2.1148 | | | |
| 所属属类-45 | Schizosaccharomyces pombe Lindner 粟酒裂殖酵母 | | | |
| 原用途-45 | 发酵乳糖、造酒、饲料等 | | | |
| ACCC2047 | ACCC2048 | AS2.214 | AS2.248 | AS2.249 |
| AS2.255 | AS2.257 | AS2.259 | AS2.260 | AS2.274 |
| AS2.994 | AS2.1043 | AS2.1149 | AS2.1178 | IFFI1056 |
| 所属属类-46 | Sporobolomyces roseus Kluyver et van Niel 掷孢酵母 | | | |
| 原用途-46 | 发酵乳糖、造酒、饲料、抗生素等 | | | |
| ACCC2049 | ACCC2050 | AS2.19 | AS2.962 | AS2.1036 |
| ACCC2051 | AS2.261 | AS2.262 | | |
| 所属属类-47 | Torulopsis Candida (Saito) Lodder 白球拟酵母 | | | |
| 原用途-47 | | | | |
| AS2.270 | ACCC2052 | | | |
| 所属属类-48 | Torulopsis famta(Harrison) Lodder et van Rij 无名球拟酵母 | | | |
| 原用途-48 | | | | |
| ACCC2053 | AS2.685 | | | |
| 所属属类-49 | Torulopsis globosa (Olson et Hammer) Lodder et van Rij 球拟酵母 | | | |
| 原用途-49 | | | | |
| ACCC2054 | AS2.202 | | | |

| | | | | |
|----------|---|---------|---------|----------|
| 所属属类-50 | Torulopsis inconspicua Lodder et Kreger van Rij 平常球拟酵母 | | | |
| 原用途-50 | | | | |
| AS2.75 | | | | |
| | | | | |
| 所属属类-51 | Trichosporon behrendii Lodder et Kreger van Rij 贝雷丝孢酵母 | | | |
| 原用途-51 | | | | |
| ACCC2056 | AS2.1193 | | | |
| 所属属类-52 | Trichosporon capitatum Diddens et Lodder 头状丝孢酵母 | | | |
| 原用途-52 | | | | |
| ACCC2056 | AS2.1385 | | | |
| 所属属类-53 | Trichosporon cutaneum(de Beurm et al.)Ota 皮状丝孢酵母 | | | |
| 原用途-53 | | | | |
| ACCC2057 | AS2.25 | AS2.570 | AS2.571 | AS2.1374 |
| 所属属类-54 | Wickerhamia fluorescens(Soneda)Soneda 威克酵母 | | | |
| 原用途-54 | | | | |
| ACCC2058 | AS2.1388 | | | |
| | | | | |

表 4. 特异性酵母扩大培养基成分表 (以 1000L 培养液计)

| 培养基成分 | 数量 |
|-------|------|
| 山楂液 | 200L |
| 五味子液 | 200L |
| 大枣液 | 200L |
| 大豆汁 | 200L |
| 苹果液 | 200L |

注: 1.上表中各种液体均是按照: 物料/水=1/10 的比例加工制成的。

2.上表培养液要调整到 $\text{pH}2.5 \pm 0.2$ 范围内。

5

10

15

20

权 利 要 求 书

1. 制备具有 NK 细胞免疫调节活性的酵母细胞的方法, 其特征在于用特定的无线电波处理酵母细胞。
- 5 2. 权利要求 1 的方法, 其中电波的频率为 7300 - 10800MHz。
3. 权利要求 1 的方法, 其中电波的强度为 115 - 445mv/cm。
4. 权利要求 1 的方法, 其中的酵母细胞选自: 酿酒酵母、椭圆酿酒酵母、薛瓦酵母、德尔布酵母、蒙古德尔布酵母、少孢酵母、发酵性酵母、洛格酵母、蜂蜜酵母、小椭圆酵母、卵形酵母、罗斯酵母、鲁氏
10 酵母、清酒酵母、树状假丝酵母、朗比克假丝酵母、克鲁斯酵母、解脂假丝酵母、中型平滑假丝酵母、近平滑假丝酵母、铁红酵母、皱褶假丝酵母、热带假丝酵母、产朊假丝酵母、阿舒假囊酵母、白地霉、异常汉逊酵母、阿拉伯糖醇汉逊酵母、杰丁汉逊酵母、土星汉逊酵母、施氏汉逊酵母、亚膜汉逊酵母、柠檬形克勒克酵母、油脂酵母、粉状毕赤酵母、
15 膜醭毕赤酵母、红冬孢酵母、红酵母、小红酵母、深红酵母、卡尔斯酵母、葡萄汁酵母、威尔酵母、路德类酵母、中国类酵母、八孢裂殖酵母、栗酒裂殖酵母、掷孢酵母、白球拟酵母、无名球拟酵母、球拟酵母、平常球拟酵母、贝雷丝孢酵母、头状丝孢酵母、皮状丝孢酵母、威克酵母。
5. 权利要求 4 的方法, 其中的酵母细胞是酿酒酵母 IFFI1048。
- 20 6. 用权利要求 1 - 5 中任一权项的方法制得的酵母细胞。
7. 一种免疫调节剂, 其特征在于含有权利要求 6 的酵母细胞作为活性成分。
8. 权利要求 6 的酵母细胞在制备用于调节、矫正或激活 NK 细胞免疫基因的药物或食品中的用途。
- 25 9. 权利要求 6 的酵母细胞在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

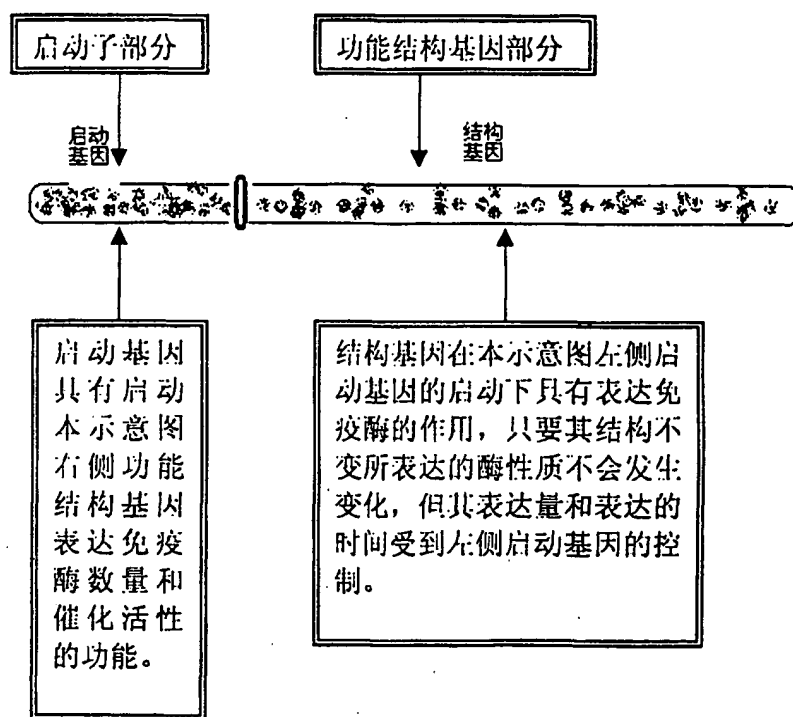


图 1

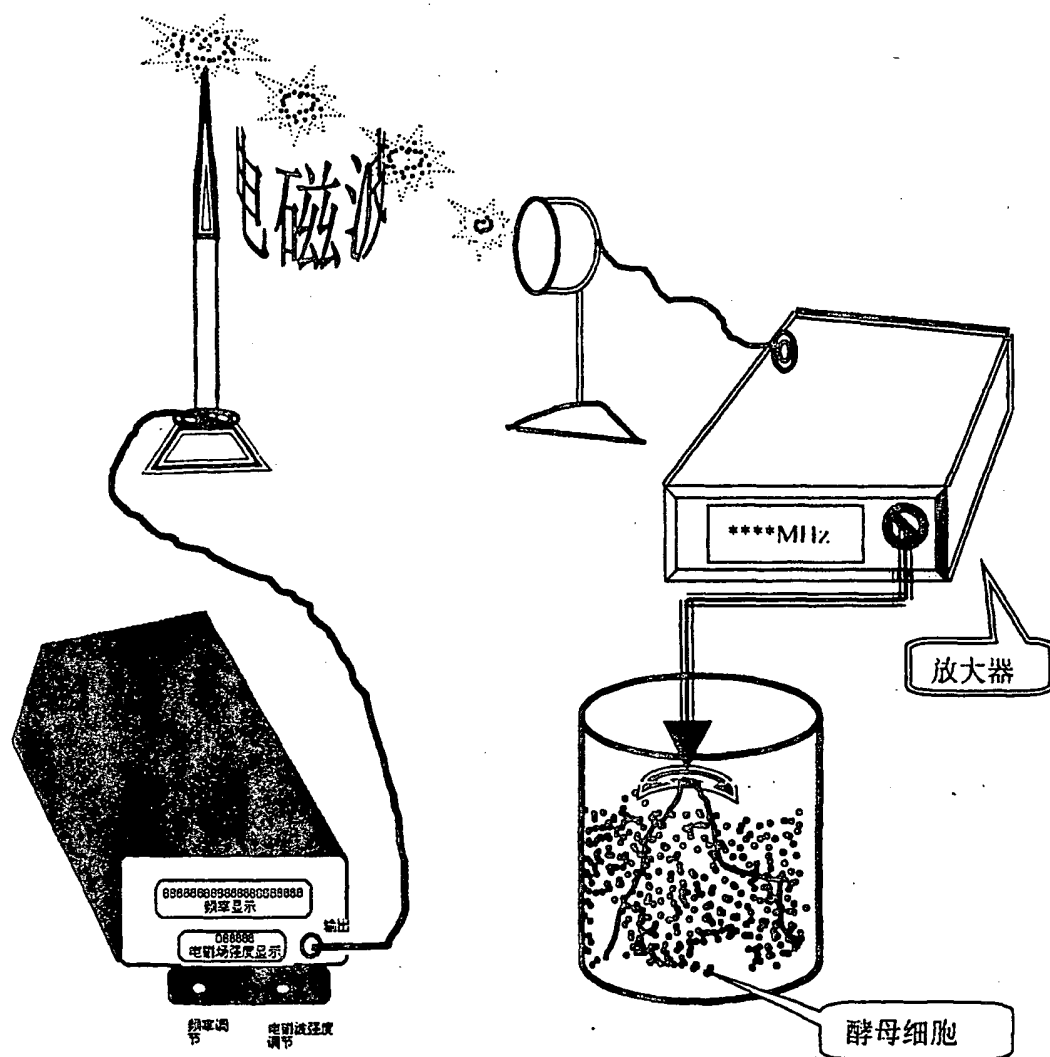


图 2

3/6

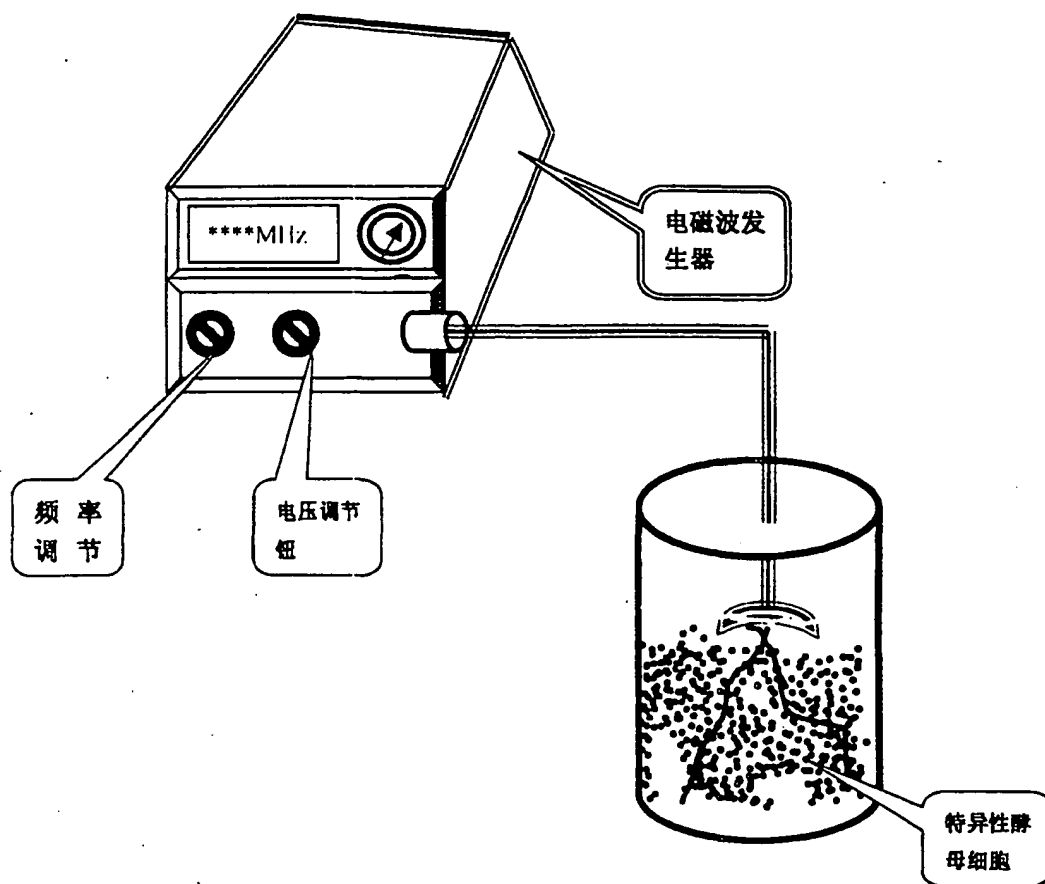


图 3

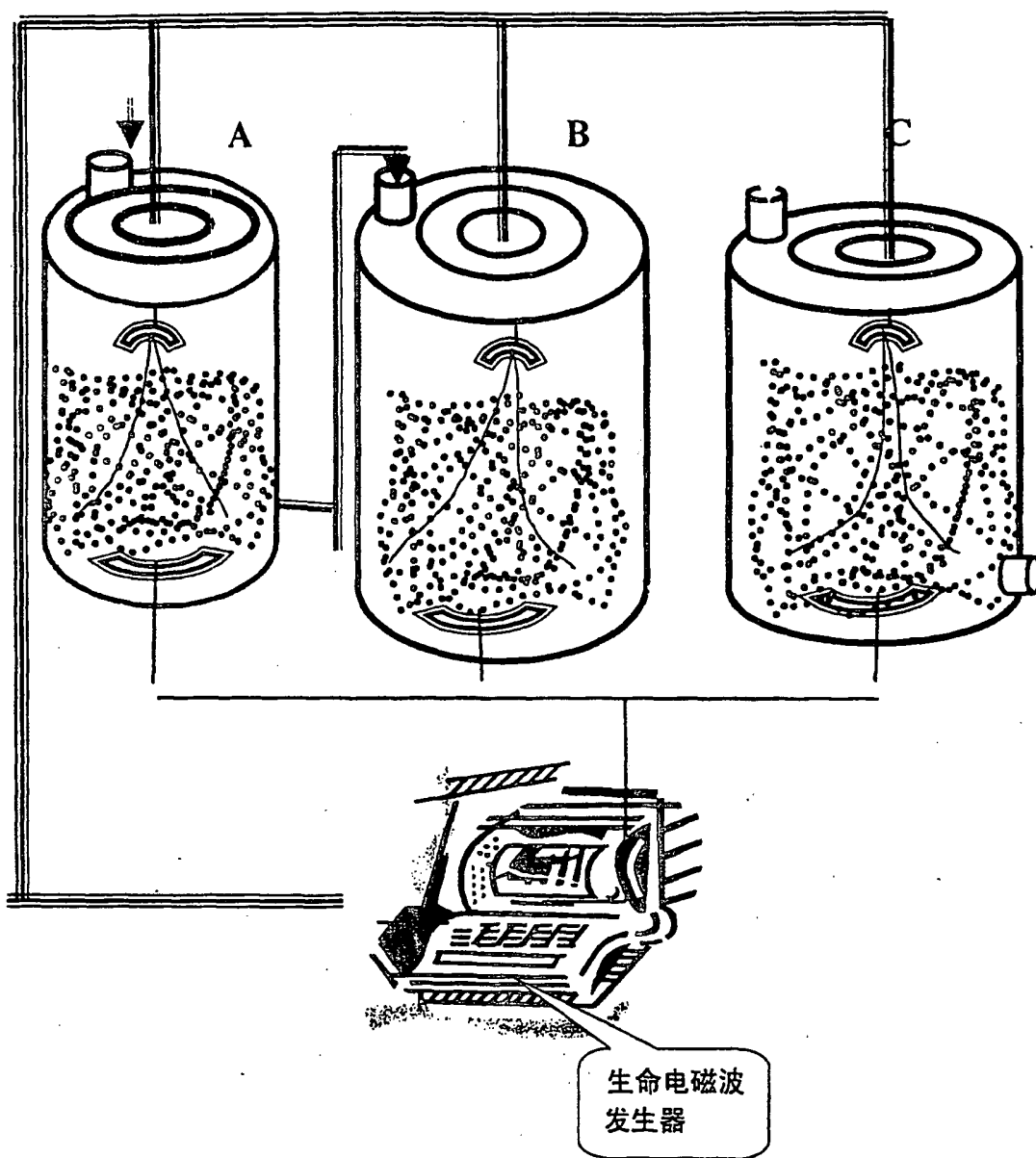


图 4

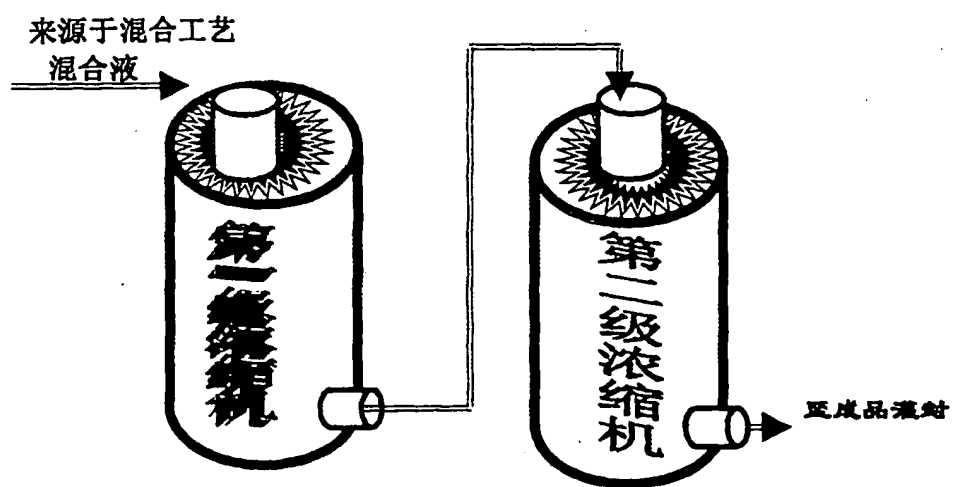


图 5

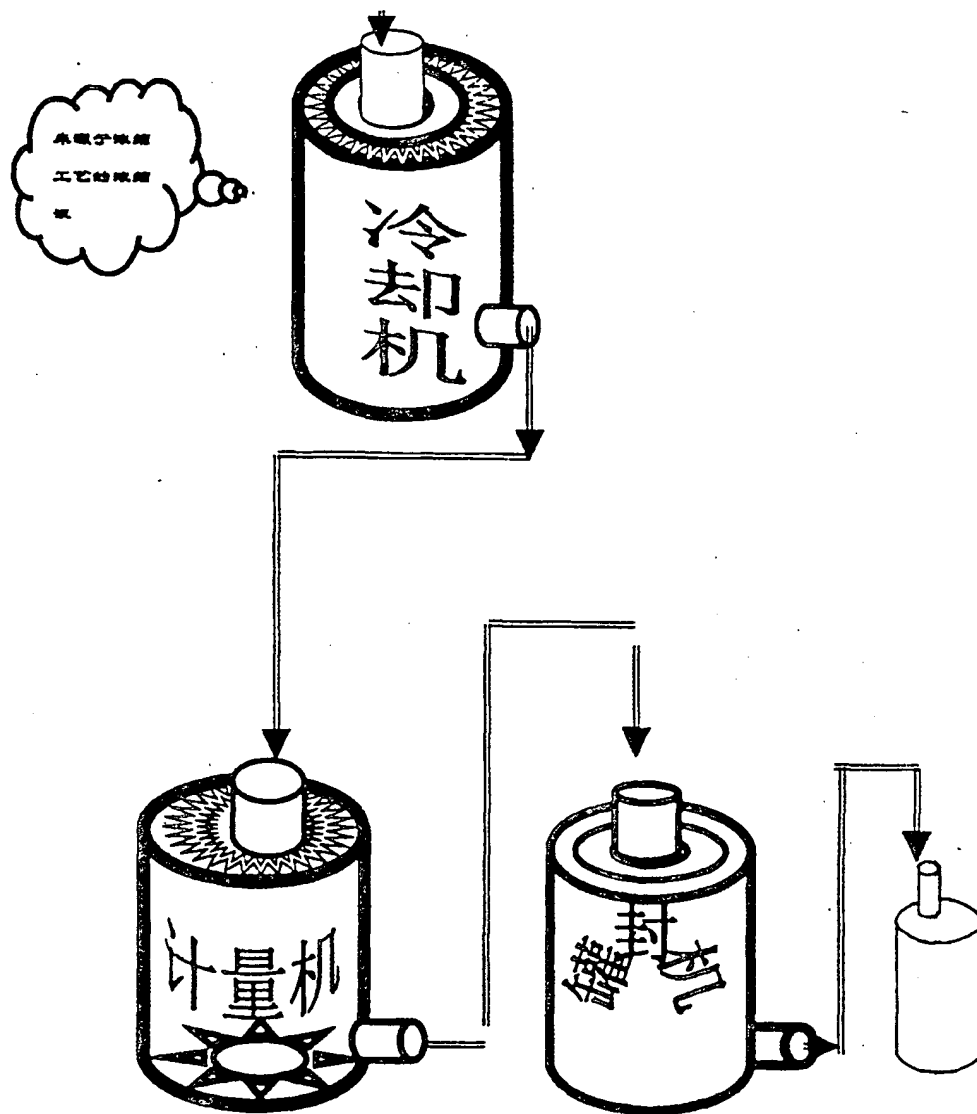


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN01/00118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ : C12N13/00,C12N1/16,A61K35/72,A61K41/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ : C12N13/00,C12N1/16,A61K35/72,A61K41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,CNPT, BIOSIS,CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant claim No. |
|-----------|--|--------------------|
| A | EP0615757 A1 1994-09-21 See the abstract. | 1-9 |
| A | SU1808331 A1 1993-04-15 See the abstract. | 1-9 |
| A | SU1592328 A 1990-09-15 See the abstract. | 1-9 |
| A | SU1174475 A 1985-08-23 See the abstract. | 1-9 |
| A | NL8402388 A 1985-03-01 See the abstract. | 1-9 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - "E" earlier document but published on or after the international filing date
 - "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)
 - "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 - "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 - "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 - "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 - "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 2001 (20.03.01)

Date of mailing of the international search report

12 APR 2001 (12.04.01)

 Name and mailing address of the ISA/
 The Chinese Patent Office
 6, Xitucheng Road, Haidian District,
 Beijing, 100088, China

Facsimile No 86-010-62019451

Authorized officer

ZENG



Telephone No. 62093733

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN01/00118

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family members | Publication date |
|---|---------------------|--------------------------|---------------------|
| EP0615757 A1 | 94.09.21 | FR2702655 A1 | 94.09.23 |
| | | CA2119192 A | 94.09.19 |
| | | CA2119192 C | 98.07.14 |
| | | IL108966 A | 98.11.26 |
| SU1808331 A1 | 93.04.15 | NONE | |
| SU1592328 A | 90.09.15 | NONE | |
| SU1174475 A | 85.08.23 | NONE | |
| NL8402388 A | 85.03.01 | FR2550223 A | 85.02.08 |
| | | SE8403914 A | 85.02.02 |
| | | JP60030677 A | 85.02.16 |
| | | DE3428017 A | 85.03.28 |
| | | GB2146028 A | 85.04.11 |
| | | CH663033 A | 87.11.13 |
| | | SE461532 B | 90.02.26 |

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN01/00118

A. 主题的分类

Int.Cl⁷: C12N13/00, C12N1/16, A61K35/72, A61K41/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl⁷: C12N13/00, C12N1/16, A61K35/72, A61K41/00

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, CNPT, BIOSIS, CA

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明 | 相关的权利要求编号 |
|------|--------------------------------|-----------|
| A | EP0615757 A1 1994-09-21 见摘要 | 1-9 |
| A | SU1808331 A1 1993-04-15 见摘要 | 1-9 |
| A | SU1592328 A 1990-09-15 见摘要 | 1-9 |
| A | SU1174475 A 1985-08-23 见摘要 | 1-9 |
| A | NL8402388 A 1985-03-01 见摘要 | 1-9 |

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

20.3 月 2001(20.03.01)

国际检索报告邮寄日期

12.4月 2001(12.04.01)

国际检索单位名称和邮寄地址

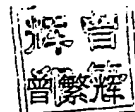
中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

授权官员



电话号码: 010-62093733

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN01/00118

| 检索报告中引用的 专利文件 | 公布日期 | 同族专利成员 | 公布日期 |
|------------------|----------|--|--|
| EP0615757 A1 | 94.09.21 | FR2702655 A1 CA2119192 A CA2119192 C IL108966 A | 94.09.23 94.09.19 98.07.14 98.11.26 |
| SU1808331 A1 | 93.04.15 | 无 | |
| SU1592328 A | 90.09.15 | 无 | |
| SU1174475 A | 85.08.23 | 无 | |
| NL8402388 A | 85.03.01 | FR2550223 A SE8403914 A JP60030677 A DE3428017 A GB2146028 A CH663033 A SE461532 B | 85.02.08 85.02.02 85.02.16 85.03.28 85.04.11 87.11.13 90.02.26 |